

L-Amino acid biosynthesis in genetically engineered coryneform bacteria with enhanced enolase activity

Inventor Name

Sugimoto, Masakazu; Ito, Hisao; Kurahashi, Osamu

Patent Assignee

Ajinomoto Co., Inc., Japan

Publication Source

PCT Int. Appl., 25 pp.

Identifier-CODEN

PIXXD2

Patent Information

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
WO 2001002543	A1	20010111	WO 2000-JP4343	20000630 <-- W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM RW: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW, AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
JP 2003180355	A2	20030702	JP 1999-189515	19990702

Priority Application Information

JP 1999-189515 A 19990702

Abstract

L-Amino acid biosynthesis using genetically engineered coryneform bacteria with enhanced enolase (eno gene) activity is disclosed. L-Amino acids are selected from L-lysine, L-glutamic acid, L-threonine, L-isoleucine, and L-serine. The enolase activity can be enhanced by increasing the copy no. of eno gene. A plasmid carrying the Escherichia coli eno gene was prep'd. and introduced into Brevibacterium lactofermentum. The transformants were able to grow well and produce significantly more L-lysine and L-glutamic acid compared to that of the parental strain.



International Patent Classification

International Patent Classification, Main

C12N001-21

International Patent Classification, Secondary

C12N015-60; C12P013-04

Document Type

Patent

Language

Japanese

Accession Number

2001:31622 CAPLUS

Document Number

134:99673

Title

Production of L-amino-acid e.g. L-lysine for use in feed additives by improved fermentation of coryneform bacterium with a gene encoding enhanced enolase activity resulting in elevated productivity.

Inventor Name

ITO, H; KURAHASHI, O; SUGIMOTO, M

Patent Assignee

(AJIN) AJINOMOTO CO INC; (AJIN) AJINOMOTO KK

Patent Information

WO 2001002543 A1 20010111 (200114)* JA 25p C12N001-21 <--
RW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL
OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW
W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ
EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK
LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG
SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
AU 2000057071 A 20010122 (200125) C12N001-21
JP 2001508316 X 20030128 (200318) C12N001-21
JP 2003180355 A 20030702 (200352) 9p C12N015-09

Application Information

WO 2000-JP4343 20000630; AU 2000-57071 20000630; WO 2000-JP4343
20000630; JP 2001-508316 20000630; JP 1999-189515 19990702

Priority Application Information

JP 1999-189515 19990702

International Patent Classification

ICM C12N001-21; C12N015-09

ICS C12N015-60; C12P013-04; C12P013-06; C12P013-08; C12P013-14

Abstract

WO 200102543 A UPAB: 20010323

NOVELTY - A coryneform bacterium has enhanced enolase activity in its cell and can produce an L-amino-acid.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a process for producing an L-amino-acid by culturing the coryneform

bacterium in a medium to produce and accumulate the L-amino-acid before isolation.

USE - Production of L-amino-acids by improved fermentation of coryneform bacterium with a gene encoding enolase, transferred to enhance such enolase activity, with elevated productivity of e.g. L-lysine and L-glutamic acid for use in feed additives and in raw material for seasoning, respectively.

ADVANTAGE - The fermentation is improved by using a coryneform bacterium with enhanced enolase activity to elevate productivity.

Dwg.0/0

Accession Number

2001-138132 [14] WP INDEX

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/02543 A1

- (51)国際特許分類: C12N 1/21, 15/60, C12P 13/04 (74)代理人: 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区京日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP00/04343 (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22)国際出願日: 2000年6月30日 (30.06.2000) (84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願平11/189515 1999年7月2日 (02.07.1999) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 京都府中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 杉本雅一 (SUGIMOTO, Masakazu) [JP/JP], 伊藤久生 (ITO, Hisao) [JP/JP], 口根 修 (KURAHASHI, Osamu) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa (JP).

添付公開官類:
— 国際調査報告書 —

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-AMINO ACID

(54)発明の名称: L-アミノ酸の製造法

(57) Abstract: A process for producing an L-amino acid such as L-lysine or L-glutamic acid by an improved fermentation method compared with the conventional methods which comprises transferring a gene encoding enolase into a coryneform bacterium capable of producing an L-amino acid such as L-lysine or L-glutamic acid and thus enhancing the enolase activity to thereby elevate the L-amino acid productivity; and strains to be used in this method.

(57)要約:

A1
WO 01/02543 A1
L-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌にエノラーゼをコードする遺伝子を導入し、エノラーゼ活性を増強することによって、これらのL-アミノ酸生産能を向上させ、従来よりもさらに改良された発酵法によるL-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸の製造法、及びそれに用いる菌株を提供する。

明細書

L-アミノ酸の製造法

技術分野

本発明は、発酵法によるL-アミノ酸の製造法、特にL-リジン及びL-グルタミン酸の製造法に関する。L-リジンは飼料添加物等として、L-グルタミン酸は調味料原料等として広く用いられている。

背景技術

従来、L-リジン及びL-グルタミン酸等のL-アミノ酸は、これらのL-アミノ酸生産能を有するブレビバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのコリネ型細菌は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。

また、組換えDNA技術によりL-アミノ酸の生合成酵素活性を増強することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、L-リジン生産能を有するコリネ型細菌において、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子（変異型lysC）、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子（dapB）、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子（dapA）、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（lysA）、及びジアミノピメリン酸デヒドログナーゼ遺伝子（ddh）（W096/40934）、lysA及びddh（特開平9-322774号）、lysC、lysA及びホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（ppc）（特開平10-165180号）、変異型lysC、dapB、dapA、lysA及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子（aspC）（特開平10-215883号）を導入することにより、同細菌のL-リジン生産能が向上することが知られている。

また、エシェリヒア属細菌においては、dapA、変異型lysC、dapB、ジアミノピ

メリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ddh）（又はテトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ遺伝子（dapD）及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子（dapE））を順次増幅又は導入するとL-リジン生産能が向上することが知られている（WO 95/16042）。尚、WO 95/16042ではテトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼがスクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼと誤記されている。

一方、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属細菌において、エシエリヒア・コリ又はコリネバクテリウム・グルタミクム由来のクエン酸シンターゼをコードする遺伝子の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に効果的であつたことが報告されている（特公平7-121228号）。また、特開昭61-268185号公報には、コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有した細胞が開示されている。さらに、特開昭63-214189号公報には、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ遺伝子、及びクエン酸シンターゼ遺伝子を増幅又は導入することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる技術が開示されている。

しかし、エノラーゼをコードする遺伝子の構造はコリネ型細菌では報告されておらず、エノラーゼをコードする遺伝子をコリネ型細菌の育種に利用することも知られていない。

発明の開示

本発明は、従来よりもさらに改良された発酵法によるL-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸の製造法、及びそれに用いる菌株を提供することを課題とする。

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、エノラーゼをコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入し、エノラーゼ活性を増強することにより、L-リジン又はL-グルタミン酸の生産量を増大させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) 細胞中のエノラーゼ活性が増強され、かつL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌。
- (2) 前記L-アミノ酸が、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-セリンから選ばれる(1)のコリネ型細菌。
- (3) 前記エノラーゼ活性の増強が、前記細菌細胞内のエノラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めることによるものである前記(1)のコリネ型細菌。
- (4) 前記エノラーゼをコードする遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である(3)のコリネ型細菌。
- (5) 前記(1)～(4)のいずれかのコリネ型細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生成蓄積せしめ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。
- (6) 前記L-アミノ酸が、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-セリンから選ばれる(5)の方法。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明のコリネ型細菌

本発明のコリネ型細菌は、L-アミノ酸生産能を有し、細胞中のエノラーゼ活性が増強されたコリネ型細菌である。L-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-セリン等が挙げられる。これらの中では、L-リジン及びL-グルタミン酸が好ましい。以下、本発明の実施の形態を、主としてL-リジン生産能又はL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌について説明するが、本発明は、目的とするL-アミノ酸固有の合成系がエノラーゼよりも下流に位置するものについては同様に適用され得る。

本発明でいうコリネ型細菌は、バージーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergery's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、

非抗酸性で、胞子形成能を有しない桿菌であり、従来プレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレビバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。L-リジン又はL-グルタミン酸の製造に好適に用いられるコリネ型細菌の菌株としては、例えば以下に示すものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
(プレビバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC14020
(プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム)	ATCC13869
(コリネバクテリウム・リリウム)	ATCC15990
(プレビバクテリウム・フラバム)	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
プレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC14066
プレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12340(FERM BP-1539)

これら入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection、住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America) より分譲を受けることができる。すなわち、各微生物ごとに對応する登録番号が付与されており、この登録番号を引用して分譲を受けることができる。各微生物に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-856
6 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にプラベスト条約に基づいて寄託さ

れている。

また、上記菌株以外にも、これらの菌株から誘導されたL-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸生産能を有する変異株等も、本発明に利用できる。この様な人工変異株としては次の様なものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン(以下、「AEC」と略記する)耐性変異株(例えば、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ11082(NRRL B-11470)、特公昭56-1914号、特公昭56-1915号、特公昭57-14157号、特公昭57-14158号、特公昭57-30474号、特公昭58-10075号、特公昭59-4993号、特公昭61-35840号、特公昭62-24074号、特公昭62-36673号、特公平5-11958号、特公平7-112437号、特公平7-112438号参照)、その成長にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号)、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ- γ アクリルラクタム、アスパラギン酸- α ナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素(テカルボキシラーゼ)または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL-リジン生産変異株(特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号)、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株(特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、フルオロビルビン酸または34°C以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株(特開昭55-9783号、特開昭53-86090号)、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するプレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株(米国特許第4411997号)。

また、L-スレオニン生産能を有するコリネ型細菌としては、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12318 (FERM BP-1172)(米国特許第5,188,949号参照)等が、L-イソロイシン生産能を有するコリネ型細菌としてはプレビバクテリウム・フラバム AJ12149 (FERM BP-759)(米国特許第4,656,135号参照)等が挙げられる。

なお、本明細書において「L-リジン等のL-アミノ酸生産能」とは、コリネ型細菌を培地に培養したときに、培地中に有意な量のL-リジン等のL-アミノ酸を蓄積する能力、又は菌体中のL-リジン等のアミノ酸含量を増加させる能力をいう。

<2>エノラーゼ活性の増強

コリネ型細菌細胞中のエノラーゼ活性を増強するには、エノラーゼをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをL-リジン又はL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のエノラーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、エノラーゼ活性が増強される。エノラーゼは、エシェリヒア・コリではeno遺伝子にコードされている。

エノラーゼ遺伝子は、コリネ型細菌の遺伝子を用いることも、エシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。

エシェリヒア・コリのeno遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Klein, M. et al., DNA Seq. 6, 315-355 (1996年), Genbank/EMBL/DDBJ accession No. X82400) ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表配列番号1及び2に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリ染色体DNAを鑄型とするPCR法 (PCR : polymerase chain reaction ; White, T.J. et al.; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) によって、eno遺伝子を取得することができる。コリネ型細菌等の他の微生物のエノラーゼをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。

染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97~98頁、培風館、1992年参照) 等により調製することができる。

PCR法により増幅されたエノラーゼをコードする遺伝子は、エシェリヒア・コリ及び/又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリ細胞に導入しておく

と、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pAM330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM1519（特開昭58-77895号公報参照）等が挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をかっこ内に示した。

pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)

コリネバケテリウム・ケルタミクムSR8201(ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)

コリネバケテリウム・ケルタミクムSR8202(ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148 コリネバケテリウム・ケルタミクムSR8203(ATCC39137)

pAJ440 パチルス・ズブチリスAJ11901(FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリAJ12617(FERM BP-3532)

エノラーゼをコードする遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、エノラーゼをコードする遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

上記のように調製した組み換えDNAをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、パチルス・ズブチリスについて報告されているような、増

殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)）がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)）も応用できる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は、電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）である。

エノラーゼをコードする活性の増強は、エノラーゼをコードする遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネ型細菌に属する微生物の染色体DNA上にエノラーゼをコードする遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レベッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、エノラーゼをコードする遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のエノラーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、エノラーゼ活性が増強される。

エノラーゼ活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上又はプラスミド上のエノラーゼをコードする遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、エノラーゼをコードする遺伝子の発現が強化されることによってエノラーゼ活性が増強される。

また、本発明のコリネ型細菌は、エノラーゼ活性に加えて、他のアミノ酸生合成経路又は解糖系等の酵素遺伝子を強化することによって、それらの酵素活性が増強されてもよい。例えば、L-リジンの製造に利用可能な遺伝子の例としては、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ α サブユニット蛋白質又は β サブユニット蛋白質をコードする遺伝子（W094/25605国際公開パンフレット）、コリネホルム細菌由来の野生型ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-87788号公報）、コリネホルム細菌由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子（特公平6-55149号公報）等が知られている。

また、L-グルタミン酸の製造に利用可能な遺伝子の例としては、グルタミン酸デヒドログナーゼ（GDH、特開昭61-268185号）、グルタミンシンテターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドログナーゼ（特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アコニット酸ヒドラターゼ（特開昭62-294086号）、クエン酸シンターゼ、ビルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号、特開昭62-55089号）、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホエノールビルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドログナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーーゼ、ホスホフルクトキナーゼ（特開昭63-102692号）、グルコースリン酸イソメラーゼ等がある。

さらに、目的とするL-アミノ酸の生合成経路から分岐して同L-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてよい。例えば、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドログナーゼがある（W095/23864参照）。また、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α ケトグルタル酸デヒドログナーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドログナーゼ、グルタミン酸デカルボキシ

ラーゼ、1-ピロリン酸デヒドログナーゼ、等がある。

さらに、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌に、界面活性剤等のビオチン作用抑制物質に対する温度感受性変異を付与することにより、過剰量のビオチンを含有する培地中にてビオチン作用抑制物質の非存在下でL-グルタミン酸を生産させることができる（W096/06180号参照）。このようなコリネ型細菌としては、W096/06180号に記載されているプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ13029が挙げられる。AJ13029株は、1994年9月2日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、受託番号FERM P-14501として寄託され、1995年8月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5189が付与されている。

また、L-リジン及びL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌に、ビオチン作用抑制物質に対する温度感受性変異を付与することにより、過剰量のビオチンを含有する培地中にてビオチン作用抑制物質の非存在下でL-リジン及びL-グルタミン酸を同時生産させることができる（W096/06180号参照）。このような菌株としては、W096/06180号に記載されているプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12993株が挙げられる。同株は1994年6月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、受託番号FERM P-14348で寄託され、1995年8月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5188が付与されている。

なお、本明細書において、酵素の「活性が増強されている」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が増強された菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味する。また、酵素の「活性が低下している」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が低下した菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味する。

<3> L-アミノ酸の生産

エノラーゼ活性が増強され、かつ、L-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を好適な培地で培養すれば、同L-アミノ酸が培地に蓄積する。例えば、エノラ

ーゼ活性が増強され、かつL-リジン酸生産能を有するコリネ型細菌を好適な培地で培養すれば、L-リジンが培地に蓄積する。また、エノラーゼ活性が増強され、かつL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を好適な培地で培養すれば、L-グルタミン酸が培地に蓄積する。

さらに、エノラーゼ活性が増強され、かつL-リジン及びL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養すれば、L-リジン及びL-グルタミン酸が培地に蓄積する。L-リジンとL-グルタミン酸を同時に醸酵生産する場合には、L-リジン生産菌をL-グルタミン酸の生産条件下で培養してもよいし、あるいはL-リジン生産能を有するコリネ型細菌とL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を混合培養してもよい（特開平5-3793号公報）。

本発明の微生物を用いてL-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸を製造するのに用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物などの炭水化物、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、酵母エキス、コーン・スティーブ・リカー、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB1などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

培養は、振とう培養、通気攪拌培養等による好気的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～9に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-アミノ酸の採取は、通常のL-アミノ酸の製造法と同様にし

て行うことができる。例えば、L-リジンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。また、L-グルタミン酸を採取する方法も常法によって行えばよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等によることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。L-リジン及びL-グルタミン酸の両方を製造する場合、これらを混合物として用いる場合には、これらのアミノ酸を相互に分離することは不要である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

<1>エシェリヒア・コリJM109株のeno遺伝子のクローニング

エシェリヒア・コリのeno遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Klein, M. et al., DNA Seq. 6, 315-355 (1996年), Genbank/EMBL/DDBJ accetion No. X82400)。報告されている塩基配列に基づいて配列表配列番号1及び2に示すプライマーを合成し、エシェリヒア・コリJM109株の染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりビルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を増幅した。

合成したプライマーの内、配列番号1は、Genbank/EMBL/DDBJ accetion No. X82400に記載されているeno遺伝子の塩基配列の1番目から24番目の塩基に至る配列に相当し、配列番号2は、2089番目から2066番目の塩基に至る配列に相当する。

エシェリヒア・コリJM109株の染色体DNAの調製は常法によった（生物工学実験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年）。また、PCR反応は、PCR法最前線（関谷剛男ほか編、共立出版社、1989年）185頁に記載されている標準反応条件を用いた。

生成したPCR産物を常法により精製後、SmaIで切断したプラスミドpHC4と、ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、クロラムフェニコール30μg/mlを含むし培地（バクトリプトン10g/L、バクトイースト

エキストラクト 5g/L、NaCl 5g/L、寒天15g/L、pH7.2) に塗布し、一晩培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。取得した形質転換体よりプラスミドを抽出し、ベクターに *eno*遺伝子が結合したプラスミド pH C 4 e n oを得た。

p H C 4 を保持するエシェリヒア・コリは、プライベートナンバーAJ12617と命名され、1991年4月24日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号F E R M P - 1 2 2 1 5として寄託され、1991年8月26日に、ブタベスト条約に基く国際寄託に移管され、受託番号F E R M B P - 3 5 3 2が付与されている。

次に、クローニングされたD N A断片がエノラーゼ活性を有するタンパク質をコードしていることを確認するため、J M 1 0 9 株及び、p H C 4 e n oを保持するJ M 1 0 9 株のエノラーゼ活性をBucher, T., Meth. Enzymol. 1, 427-435 (1955)に記載の方法により測定した。その結果、p H C 4 e n oを保持するJ M 1 0 9 株は、p H C 4 e n oを保持しないJ M 1 0 9 株の約15倍のエノラーゼ活性を示すことから、*eno*遺伝子が発現していることを確認した。

<2>コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産株へのp H C 4 e n oの導入とL-グルタミン酸生産

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ13029を電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）によりプラスミドpHC4enoで形質転換し、得られた形質転換株を得た。得られた形質転換株AJ13029/pHC4enoを用いてL-グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。5μg/mlのクロラムフェニコールを含むCM 2 Bプレート培地にて培養して得たAJ13029/pHC4eno株の菌体を、5μg/mlのクロラムフェニコールを含む下記組成を有するL-グルタミン酸生産培地に接種し、31.5°Cにて振とう培養し、培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。得られた培養物を、同じ組成の培地に5%量接種し、37°Cにて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてコリネバクテリウム属細菌AJ13029株に、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミド p H C 4 を電気パルス法により形質転換した菌株を上記と同様にして培養した。

〔L-グルタミン酸生産培地〕

下記成分（1 L中）を溶解し、KOHでpH8.0に調製し、115°Cで15分殺菌する。

グルコース	150g
K H ₂ P O ₄	2g
M g S O ₄ · 7 H ₂ O	1.5g
F e S O ₄ · 7 H ₂ O	15mg
M n S O ₄ · 4 H ₂ O	15mg
大豆蛋白加水分解液	50ml
ビオチン	2mg
サイアミン塩酸塩	3mg

培養終了後、培養液中のL-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザーAS-210により測定した。このときの結果を表1に示した。

表1

菌 株	L-グルタミン酸生成量(g/L)
AJ13029/pHC4	20.9
AJ13029/pHC4eno	23.4

<3>コリネ型細菌のL-リジン生産株へのpHC4enoの導入とL-リジン生産
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ11082を電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）によりプラスミドpHC4enoで形質転換し、得られた形質転換株を得た。得られた形質転換株AJ11082/pHC4enoを用いてL-リジン生産のための培養を以下のように行った。5μg/mlのクロラムフェニコールを含むCM2Bプレート培地にて培養して得たAJ11082/pHC4eno株の菌体を、5μg/mlのクロラムフェニコールを含む下記組成のL-リジン生産培地に接種し、31.5°Cにて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてコリネバクテリウム属細

菌AJ11082株に、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミドpHC4を電気パルス法により形質転換した菌株を上記と同様にして培養した。

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ11082は、1981年1月31日に農学研究菌培養収集所 (Agricultural Research Culture Collection、アメリカ合衆国 イリノイ州 61604 ピオリア ノースユニバーシティ通り 1815 (1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A.)) に国際寄託され、受託番号NRRL B-11470が付与されている。

〔L-リジン生産培地〕

炭酸カルシウム以外の下記成分 (1 L中) を溶解し、KOHでpH8.0に調製し、115°Cで15分殺菌した後、別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを50 g加える。

グルコース	100 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
ビオチン	500 μg
チアミン	2000 μg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
ニコチンアミド	5 mg
蛋白質加水分解物 (豆濃)	30 ml
炭酸カルシウム	50 g

培養終了後、培養液中のL-リジン蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザーアス-210により測定した。このときの結果を表2に示した。

表2

菌 株	L-リジン生成量(g/L)
AJ11082/pHC4	29.5
AJ11082/pHC4eno	32.4

<4>コリネ型細菌のL-リジン及びL-グルタミン酸生産株へのpHC4enoの導入とL-リジン及びL-グルタミン酸同時生産

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12993を電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）によりプラスミドpHC4enoで形質転換し、得られた形質転換株を得た。得られた形質転換株AJ12993/pHC4enoを用いてL-リジン及びL-グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。5μg/mlのクロラムフェニコールを含むCM2Bプレート培地にて培養して得たAJ12993/pHC4eno株の菌体を、5μg/mlのクロラムフェニコールを含む前記L-リジン生産培地に接種して31.5°Cにて培養した。培養を開始してから12時間後に培養温度を34°Cにシフトし、培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてコリネバクテリウム属細菌AJ12993株に、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミドpHC4を電気パルス法により形質転換した菌株を上記と同様にして培養した。

培養終了後、培養液中のL-リジン及びL-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザーアス-210により測定した。このときの結果を表3に示した。

表3

菌 株	L-リジン生成量(g/L)	L-グルタミン酸生成量(g/L)
AJ12993/pHC4	10.2	19.1
AJ12993/pHC4eno	12.4	21.5

産業上の利用可能性

本発明により、コリネ型細菌のL-リジン又はL-グルタミン酸等のL-アミノ酸の生産能を向上させることができる。

請求の範囲

1. 細胞中のエノラーゼ活性が増強され、かつL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌。
2. 前記L-アミノ酸が、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-セリンから選ばれる請求項1記載のコリネ型細菌。
3. 前記エノラーゼ活性の増強が、前記細菌細胞内のエノラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めることによるものである請求項1記載のコリネ型細菌。
4. 前記エノラーゼをコードする遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である請求項3記載のコリネ型細菌。
5. 請求項1～4のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生成蓄積せしめ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。
6. 前記L-アミノ酸が、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-セリンから選ばれる請求項5記載の方法。

1/2

Sequence Listing

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)

<120> L-アミノ酸の製造法

<130> B639MSOP1022

<150> JP 11-189515

<151> 1999-07-02

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Esherichia coli eno gene

<400> 1

aactagtgac ttgaggaaaa ccta

24

<210> 2

2/2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Esherichia coli eno gene

<400> 2

ttccaagtgc aaattgccgt atta

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N1/21, 15/60, C12P13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N1/20-1/21, 15/60, C12P13/04-13/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 841395, A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 13 May, 1998 (13.05.98) & WO, 96/40934, A1 & MX, 9709923, A1 & KR, 99022521, A & AU, 9659107, A & ZA, 9604665, A & BR, 9606379, A & CZ, 9703903, A3 & SK, 9701640, A3 & HU, 9802666, A2	1-6
A	JP, 63-119688, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 24 May, 1988 (24.05.88) (Family: none)	1-6
A	EP, 857784, A2 (AJINOMOTO CO., INC.), 12 August, 1998 (12.08.98) & BR, 9706058, A & JP, 10-165180, A & SK, 9701635, A3 & HU, 9702361, A2	1-6
A	JP, 63-214189, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 06 September, 1988 (06.09.88) (Family: none)	1-6
A	KLEIN, Michael et al., "Cloning, nucleotide sequence, and functional expression of the Escherichia coli enolase (eno) gene in a temperature-sensitive eno mutant strain",	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 October, 2000 (02.10.00)	Date of mailing of the international search report 10 October, 2000 (10.10.00)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	DNA Sequence, 1996, Volume 6, Number 6, pages 351-355	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/04343

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N1/21, 15/60, C12P13/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N1/20-1/21, 15/60, C12P13/04-13/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 841395, A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 13.5月.1998 (13.05.98) & WO, 96/40934, A1 & MX, 9709923, A1 & KR, 99022521, A & AU, 9659107, A & ZA, 9604665, A & BR, 9606379, A & CZ, 9703903, A3 & SK, 9701640, A3 & HU, 9802666, A2	1-6
A	JP, 63-119688, A (協和醸酵工業株式会社) 24.5月.1988 (24.05.88), (ファミリーなし)	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 02.10.00	国際調査報告の発送日 10.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田俊生 印 4 N 8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	EP, 857784, A2 (AJINOMOTO CO., INC.) 12.8月.1998 (12.08.98) & BR, 9706058, A & JP, 10-165180, A & SK, 9701635, A3 & HU, 9702361, A2	1-6
A	JP, 63-214189, A (旭化成工業株式会社) 6.9月.1988 (06.09.88), (ファミリーなし)	1-6
A	KLEIN, Michael et al., "Cloning, nucleotide sequence, and functional expression of the <i>Escherichia coli</i> enolase (<i>eno</i>) gene in a temperature-sensitive <i>eno</i> mutant strain", DNA Sequence, 1996, Volume 6, Number 6, pages 351-355	1-6

THIS PAGE BLANK (USPTO)